

Toxoplasmosis

BIOLOGÍA MOLECULAR

Diagnóstico anatomopatológico y molecular de toxoplasmosis en marsupiales australianos en cautiverio en México

Carlos Cedillo-Peláez¹, Claudia Patricia Rico-Torres¹, Ignacio Carlos Rangel-Rodríguez², David Espinosa-Avilés³, Carlos Gerardo Salas-Garrido⁴, Osvaldo López-Díaz², Mariela Díaz-Negrete², Dolores Correa¹

¹ Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México, D.F., México

² Laboratorio de Patología, Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre, Gobierno del Distrito Federal, México, D.F., México

³ Zoológico de Guadalajara, México

⁴ Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción. El diagnóstico de *Toxoplasma gondii* en marsupiales australianos se lleva a cabo mediante con la identificación del parásito o anticuerpos contra éste por técnicas anatomopatológicas o serológicas, respectivamente, mientras que el diagnóstico molecular de *T. gondii* en estos animales, generalmente, se realiza por PCR; sin embargo, los estudios de identificación del genotipo involucrado son escasos.

Los objetivos de este trabajo fueron describir los hallazgos anatomopatológicos, realizar el diagnóstico molecular y el genotipo de *T. gondii* en casos de toxoplasmosis en marsupiales australianos en cautiverio, de dos zoológicos de México.

Materiales y métodos. Se recuperaron muestras de tejidos fijados en formaldehído o recolectados en fresco de 18 animales con diagnóstico sugestivo o compatible con toxoplasmosis, procesándose por la metodología de rutina para histopatología, inmunohistoquímica, PCR y análisis de polimorfismos de patrones de restricción (PCR-RFLP).

Resultados. Microscópicamente, en pulmón, hígado, bazo, ganglios, estómago, miocardio y encéfalo, se observaron lesiones de tipo necrótico con infiltrado inflamatorio y presencia de estructuras parasitarias compatibles con taquizoítos o quistes tisulares de *T. gondii*, confirmados por inmunohistoquímica en, por lo menos, un tejido de 12 casos. Las muestras de 11 de 18 casos fueron positivas por PCR, por los

menos, a un gen; por PCR-RFLP se determinaron alelos para el genotipo I y atípico (con un alelo extra) en los productos de PCR de *GRA6* y *SAG3*.

Discusión. Los resultados obtenidos difieren de los descritos en la literatura, que corresponden a genotipo III en wallabies y genotipos II, III y atípicos en canguros.

• • •

Evaluation of the possible antigenic activity of ROP18 from *Toxoplasma gondii*

D. M. Primrose, B. H. Zimmermann

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction. ROP18 has been identified as a virulence factor in *Toxoplasma gondii*. This protein is produced in rhoptries and is associated with the intracellular proliferation of the parasite.

ROP18 was amplified by PCR from Colombian strains and control strains. Recombinant truncated protein ROP18 of type I strain was expressed and purified from *E. coli* under denaturing conditions. It was obtained in soluble form using a refolding method. Recombinant ROP18 was observed to be antigenic using serum from mice infected with *T. gondii*, whereas no reaction was observed with serum from uninfected mice.

Materials and methods. Primers to amplify ROP18 from native Colombian strains and control strains were designed. A sense primer was designed to eliminate the transmembrane section of the coding sequence for production of a truncated recombinant protein. The truncated type I ROP18 was subcloned into the pET-19b expression vector producing a recombinant protein with an N-terminal His-tag. The recombinant protein produced in *E. coli* formed inclusion bodies, and was solubilized with urea and purified on Ni-NTA resin. A refolding procedure using decreasing concentrations of urea rendered ROP18 in soluble form. Anti-penta His-tag antibodies were used to detect the histidine tag of the recombinant protein. In order to determine whether ROP18 was antigenic, sera from *T. gondii* infected mice were used as primary antibodies, using tachyzoites as a positive control.

Results. The complete and truncated sequences of ROP18 type I were obtained. Induction showed production of recombinant ROP18 and was confirmed by anti His-tag reaction on Western blot. ROP18 was observed to be antigenic.

Conclusions. ROP18 was cloned, expressed, purified, and solubilized. Both tachyzoites and purified ROP18 reacted with serum from infected mice but did not react with serum from uninfected mice. This antigenicity could allow for the development of a simple detection test for *T. gondii*.

• • •

Anticuerpos para péptidos derivados de las proteínas ROP18 Y ROP16 en toxoplasmosis humana

Delia Piedad Recalde-Reyes, Claudia López, Marcela García, Néstor Cardona, Alejandra De la Torre, Jorge Gómez-Marín

Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío; Programa de Bacteriología, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia

Introducción. El parásito intracelular *Toxoplasma gondii* secreta variedad de proteínas ROP tipo cinasa-serina-treonina por medio de las roptrias (organelos-apicales), que determinan su virulencia; el aumento de su expresión durante la invasión, se traduce en un aumento de la proliferación de parásitos.

Este trabajo tuvo por objetivo evaluar, por medio de pruebas ELISA, la respuesta inmune *in vitro* de humanos con toxoplasmosis asintomática y toxoplasmosis ocular, a péptidos derivados de la proteína ROP 18 (linaje de clones I, II y III) y péptidos derivados de la proteína ROP 16 (cepas virulentas y avirulentas) con el fin de determinar si existía capacidad inmonogénica humoral específica.

Materiales y métodos. Para la prueba ELISA, se usaron 30 sueros de individuos con toxoplasmosis con lesiones oculares y sin ellas. Para definir el punto de corte de la prueba se usaron 18 sueros negativos para toxoplasmosis. Las muestras se procesaron en duplicado y se realizaron cuatro ensayos para cada una. La lectura se hizo en el lector STATFAX2600, con filtro de referencia (450/630nm).

Resultados. Trece de 30 sueros (43 %) reconocieron uno o más péptidos de la proteína ROP18; 7 (23 %) reconocieron el péptido tipo I; 8, el péptido tipo II (26 %), y 5 el péptido tipo III (16 %). Tres sueros reconocieron los tres péptidos, dos sueros reconocieron dos péptidos, un suero los de tipo I y II, y otro suero los del tipo II y III. Para los

péptidos derivados de ROP 16, el de tipo virulento fue reconocido por 22 % de los sueros y el péptido de cepa avirulenta, por 6 %. No hubo diferencias significativas en la presencia de anticuerpos específicos y la forma clínica.

Conclusiones. No todos los sueros de pacientes con diagnóstico de toxoplasmosis responden a los péptidos derivados de las proteínas ROP 18 y ROP 16. Los péptidos analizados no permitieron distinguir el linaje de clones que está causando la infección pues hubo reacción cruzada.

• • •

Identificación de un gen codificador para la enzima fosfolipasa A2 putativa de *Toxoplasma gondii*, modelo estructural y búsqueda de inhibidores

Diego Moncada, Jorge Gómez, Ailan Arenas, Diego Molina

Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. Las fosfolipasas a2 son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, catalizan la hidrólisis del enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos, principalmente, ácido araquidónico y lisofosfolípidos. En *Toxoplasma gondii* se había reportado la actividad fosfolipasa A2 pero no se había identificado ningún gen codificador de estas enzimas.

Materiales y métodos. Se condicionó el algoritmo de búsqueda (ProteinMotifPattern) en la base datos ToxoDB, basado en el modelo de Markov PA2_HIS, código Prosite (PS00118) con la secuencia CC.HD. Se realizó una RT-PCR a partir de ARN total de taquizoíto (cepa RH). Se obtuvo un modelo estructural de la proteína en el servidor MUSTER (Multi-Sources ThreadER); se identificaron las regiones funcionales con los servidores PROSITE Y SOSUI y se validó el modelo por medio de la herramienta PROCHECK.

Las geometrías de los ligandos sodio 2-(1-bencil-2-etil-3-oxamoilindol-4-il)oxiacetato y metil 2-(1-bencil-2-etil-3-oxamoilindol-4-il)oxiacetato se equilibraron con el operador de mecánica molecular de campo de fuerza universal (*Universal Field Force*, UFF); después fueron encajados en el sitio catalítico de la histidina interactuando con los aminoácidos CCESHDSC mediante un protocolo de *docking* de cuerpo rígido con el programa Arguslab.

Resultados. Se encontró el gen candidato TGGT1_112700. Se obtuvo un amplificado de 540 pb que confirmaba la expresión del gen. El

modelo mostró 100 % de los residuos en regiones favorables en el gráfico de RAMACHANDRAN; se identificaron dos hélices transmembrana entre las posiciones 44-66 y 108-121 y un dominio PA2_HIS entre los aminoácidos 171 y 178. En la mejor posición de los ligandos, interactuando con el dominio PA2_HIS, se registró una energía de -6,5225 y -6,3776 kcal/mol, respectivamente.

Conclusión. En este trabajo se reporta por primera vez la expresión un gen cuyo producto hipotético muestra una fosfolipasa A2 asociada a la membrana de *T. gondii*. Esta proteína podría representar un nuevo blanco para intervenciones farmacológicas en el tratamiento de la toxoplasmosis.

• • •

Orotidine 5'-monophosphate decarboxylase of *Toxoplasma gondii*: Cloning and identification of different alternative splicing pattern

Heidy Y. Narváez, Gabriel L. Lozano, Bárbara H. Zimmermann
Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction. Toxoplasmosis is caused by an intracellular obligate parasite, *Toxoplasma gondii*. The current treatments against toxoplasmosis display side effects and adverse reactions in many patients. Thus, it is important to seek new targets for drug design. The *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway in the intracellular parasite *T. gondii* has gained importance because it is necessary for virulence and survival. The sixth enzyme of the pathway, orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (ODCase), catalyzes the decarboxylation of OMP to UMP. We planned to characterize this enzyme because it could be an important point of regulation of the pathway.

Materials and methods. We performed a cDNA Library screening by PCR. The putative gene was cloned into pGEM-T Easy vector and subcloned into pET-15b vector. TgODCase recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21, and was purified by Ni-NTA technology. PyrF- mutant cells lacking the ODC gene were complemented with TgODCase cloned into TOPO-TA vector.

Results. A unique putative ORF, TGME49_059690, composed of six exons was identified in the *T. gondii* genome database. Different mRNAs from a tachyzoite RH cDNA library that contained parts of the TgODCase sequence were identified. Only one mRNA, identical to the putative sequence, shows functionality, either by complementing an *E. coli* strain deficient in ODCase activity, as well as an

activity assay of the recombinant protein. A yield of 10.3 mg purified protein per 1L cell culture was obtained. Differences with the other sequences are in presence/absence of the intron 5 and 52 nucleotides on the 5'-end of putative exon 2.

Conclusions. The data suggest the presence of different pattern of alternative splicing in TgODCase. This isn't a new mechanism reported in *T. gondii*. However the genes reported in *T. gondii* is low if compared with the 74% of human gene that are alternatively spliced. This mechanism would downregulate the level of a functional mRNA, without modification of the promoter activity. If confirmed, this would indicate a new transcriptional regulation mechanism for the pathway.

• • •

Estandarización de la prueba reacción en cadena de la polimerasa para el gen repetitivo *RE* de *Toxoplasma gondii*

Jessica Triviño, Fabiana Lora, Néstor Cardona, Jorge E. Gómez
Grupo de Estudio en Parasitología Molecular,
Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado, protozoo de distribución universal y, posiblemente, el agente más habitual de infección protozoaria en el hombre. El gato actúa como huésped definitivo y el hombre como huésped intermediario. *Toxoplasma gondii* puede ocasionar una infección aguda en la toxoplasmosis congénita e infecciones graves en el paciente inmunosuprimido.

El objetivo de este trabajo fue establecer parámetros para estandarizar la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita en el líquido amniótico.

Materiales y métodos. La extracción de ADN para las muestras clínicas de líquido amniótico y los parásitos de *T. gondii* (la cepa de tipo I de líquido peritoneal de ratón) se realizaron con el estuche comercial *Wizard Genomics ADN* de Promega. Se amplificó el gen *B1*, utilizando la metodología de PCR anidada. El gen *RE* se amplificó con una PCR simple. Se determinó la especificidad de los cebadores para *RE* realizando un ensayo con ADN de *Candida* spp., *Blastocystis* spp. y sangre de humano con serología negativa para *Toxoplasma* sp. También se utilizó el programa BLAST (21) para determinar la especificidad de los cebadores.

Resultado. Se hicieron 25 ensayos de PCR para el gen repetitivo *RE*. La visualización de una banda clara con el peso molecular esperado se consideró

como un resultado óptimo. No se observó producto de amplificación en los controles negativos. La temperatura media óptima para *RE* fue de 60 °C por 30 segundos. El protocolo para la amplificación se llevó a cabo en 1 hora y 15 minutos.

Conclusiones. Este estudio demuestra que la utilización de la PCR para la amplificación del gen repetitivo *RE* tiene gran potencial para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita.

• • •

Eficiencia del cultivo *in vitro* de *Toxoplasma gondii* en diferentes líneas celulares

Jorge Andrés Cuéllar, Alejandro Hernández, Enrique Villegas, Jorge Enrique Gómez
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. El cultivo *in vitro* es un método importante para la obtención de *Toxoplasma gondii* con fines de diagnóstico clínico o biotecnológico.

El objetivo del trabajo fue estandarizar las condiciones de cultivo celular que permitan obtener una alta eficiencia de *T. gondii* en diferentes líneas celulares.

Materiales y métodos. Se determinó la curva de crecimiento para las células THP-1 y Vero. Se calculó el índice de rendimiento de *T. gondii*, cepa RH, y el aislamiento CIBM1 en células THP-1. Para la identificación de *T. gondii*, cepa RH, y el aislamiento CIBM1 en células THP-1 y Vero, se hizo citometría de flujo y se analizó la evolución del crecimiento de las células EPR (epitelio pigmentario de la retina) de bovino con la cepa RH de *T. gondii*.

Resultados. Las células Vero crecen más rápidamente que las células THP-1, pero en estas últimas es mejor el rendimiento de *T. gondii*. El aislamiento CIBM1 mostró mayor rendimiento con bajos inóculos de taquizoítos en comparación con la cepa RH del parásito. La identificación de la invasión por citometría de flujo mostró que el aislamiento CIBM1 infectaba más células que la cepa RH. Se realizó una evolución macroscópica de las tres líneas celulares, con invasión en células EPR de bovino y THP-1, lo que mostró que las células EPR no eran invadidas a los 2 ni a los 5 días después de la invasión, mientras que sí se presentaba en las células THP-1. Este comportamiento de invasión se confirmó con una tinción de Giemsa.

Conclusiones. Este es el primer estudio que demuestra una evolución macroscópica de las células EPR de bovino y su invasión con *T. gondii*.

Clonación, expresión y purificación de una proteasa tipo tripsina de los cromosomas IX y XII de *Toxoplasma gondii*

Marcela García, Jorge Gómez, Aylan Arenas
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia; Facultad de Bacteriología, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia

Introducción. Las proteasas son importantes durante el proceso de invasión por los parásitos del segundo nivel de Apicomplexa. El papel de la proteasas es más claro durante las etapas de adhesión y penetración de los taquizoítos a las células huésped, pero poco se conoce sobre las proteasas que actúan en las etapas anteriores a la adhesión sobre la célula huésped. Se identificó que los dominios de estas proteínas son de la familia trypsin-like. Por lo tanto, se pretendió obtener una proteína recombinante para el gen de serina proteasa de tipo tripsina TGGT1007070 del cromosoma XII de 580 pb y TGGT1032310 del cromosoma IX de 571 pb (Tg TRYP II; Tg TRYP III).

Para lograr este objetivo se hizo necesario clonar, expresar y purificar la proteína recombinante tipo tripsina, y determinar la eficiencia de expresión de la proteína recombinante TgTRYP II y TgTRYP III; además, probar la actividad enzimática de la proteína. Los estudios *in vitro* han demostrado que si se adicionan inhibidores específicos de serinas proteasas tipo tripsina en un cultivo celular, se reduce notablemente la invasión del parásito a la célula huésped.

Materiales y métodos. Utilizando herramientas de bioinformática y análisis evolutivo de las tripsinas proteasas, se encontraron tres genes homólogos en el genoma de *T. gondii*. Se ejecutó la extracción de ARN; para el RT-PCR se continuó con la purificación de los productos de PCR. A partir de éstos, se realizó la secuenciación de los productos. Ya obtenido el resultado, se procedió a clonar y se empleo *Escherichia coli* como célula anfitriona. El vector se ligó a la secuencia de ADN de interés, es decir, la detección de la proteína recombinante generada. Seguidamente, la expresión se evidenció mediante gel de poliacrilamida. Finalmente, la purificación ensayó la actividad proteolítica de la proteína recombinante por medio de la prueba colorimétrica con azocaseína.

Resultados. Se logró clonar, obtener una proteína recombinante tipo tripsina Tg TRIP I y TgTRIP III en *T. gondii* y se demostró la actividad proteolítica de tipo proteasa de dominio serina proteasa

de *T. gondii* y, por consiguiente, éstas podrían considerarse en un futuro como un posible blanco terapéutico.

• • •

Dihydroorotate dehydrogenase as potential drug target against toxoplasmosis

Miryam Andrea Hortúa-Triana¹, My-Hang Huynh², Barbara A. Fox³, David J. Bzik³, Vern B. Carruthers², Monika Löffler⁴, Barbara H. Zimmermann¹

¹ Grupo de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

² Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

³ Department of Microbiology and Immunology, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH, USA

⁴ Institute of Physiological Chemistry, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

Introduction. Dihydroorotate dehydrogenase is the fourth enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway, catalyzes the oxidation of dihydroorotate to orotate. TgDHOD belongs to the membrane-associate family 2 enzymes, that are usually located at the outer surfaces of the plasma or inner mitochondrial membranes, where they transfer electrons via FMN to quinones and are thus linked to the respiratory chain. This enzyme is a promising antiparasitic target.

Methodology. The N-terminally truncated recombinant protein, TgDHOD-VSSM was expressed, purified and characterized. Activities of purified recombinant proteins were measured by monitoring 2,6 dichlorophenol-indophenol (DCIP) reduction, a reaction coupled to dihydroorotate substrate via quinone cosubstrate oxidation (Knecht & Löffler, 1998). To determine the effect of inhibitors, DHOD activity was measured by the DCIP reduction assay with Q_D as the ubiquinone in presence of the different inhibitors.

Results. The yield of purified recombinant TgDHO-VSSM was approximately 2.8mg per liter of bacterial culture and the specific activity measured using Q_D as electron acceptor was 83.8U/mg. The purified protein had a k_{cat} of $89.2 \text{ sec}^{-1} \pm 1.5$, a K_m of $60.3 \pm 0.002 \mu\text{M}$ for L-dihydroorotate, and a K_m of $28.9 \mu\text{M} \pm 1.8$ for decylubiquinone (Q_D). Different artificial electron acceptors were tested. Q_D ($K_m=28.9 \mu\text{M}$) and Q₆ ($K_m=51.4 \mu\text{M}$) exhibited low K_m s compared to Q₀ ($K_m=99.2 \mu\text{M}$). The ubiquinones present in *T. gondii* have not yet been identified. The IC₅₀ for TgDHOD determined for three compounds known to

inhibit *Human* DHOD at nanomolar concentrations were: A77-1726, $91.2 \mu\text{M} \pm 2.2$; DCL, $110.5 \mu\text{M} \pm 9.7$; Redoxal, $253.3 \mu\text{M} \pm 13.3$. Derivatives of A77-1726, kindly provided by the Fishwick/Johnson-Lab, University of Leeds, were tested and had the following IC₅₀s: MD108, $1224.4 \mu\text{M} \pm 10.8$; MD209, $36.2 \mu\text{M} \pm 4.0$ and MD249, $35.4 \mu\text{M} \pm 2.3$; MD241, $34.1 \mu\text{M} \pm 3.2$. We are currently determining the inhibition constant (Ki) for the best inhibitory compounds found so far.

Conclusion. Overall our findings suggest that there are significant differences between the inhibitor binding site of human DHOD and TgDHOD which could be exploited to design specie-specific drugs.

• • •

Genotipificación directa del gen *rop18* de *Toxoplasma gondii* en muestras clínicas humanas

Víctor Alfonso Sánchez-Pachón, Alejandra de la Torre-Cifuentes, Jorge Enrique Gómez-Marín

Grupo de Estudio en Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. El análisis genético del *locus* del gen *rop18* se realizó para determinar la prevalencia de genotipos virulentos de *Toxoplasma gondii* de ratón en muestras clínicas humanas en Colombia.

Materiales y métodos. Se analizaron 281 muestras de sangre. Cuarenta muestras IgG anti-*Toxoplasma* negativas fueron negativas y 123 muestras de 241 IgG anti-*Toxoplasma* positiva fueron positivas por el ensayo de PCR específico del gen *b1* de *T. gondii*. En 20 muestras positivas para el gen *rop18*, se determinó por una PCR alelo específico, si el paciente tiene inserción positiva “corriente arriba” de la secuencia de *rop18*, cepa de *T. gondii* (cepa avirulenta en ratón) o la inserción negativa “corriente arriba” de la secuencia de *rop18*, cepa de *T. gondii* (cepa virulenta en ratón).

Resultados. Ocho de 13 (61,5 %) pacientes con toxoplasmosis ocular y 6 de 7 (80 %) de los pacientes con la forma clínica asintomática o ganglionar fueron positivas para la presencia de parásitos con la secuencia de inserción “corriente arriba”, en la región promotora del gen *rop18*. En los pacientes con toxoplasmosis ocular, una reacción inflamatoria superior en el ojo se asoció con un resultado de PCR negativo para la región “corriente arriba” de *rop18*.

Conclusiones. Los resultados demuestran que es posible llevar a cabo una genotipificación directa por la presencia de la secuencia de inserción del promotor del gen *rop18* en muestras clínicas.